

論文内容の要旨

申請者氏名 與那嶺 育子

酵母の塩ストレス下における Na^+ 排出は、主に Na^+ 排出ポンプ (ATPase) である Ena1 により行われており、その遺伝子 (*ENA1*) の発現は 2 種の脱リン酸化酵素、PP2B、Ppz1、によってそれぞれ正と負に制御されている。さらに、Hal3 タンパク質は Ppz1 を負に制御している。したがって、*HAL3* 遺伝子の高発現は *ENA1* 遺伝子の発現を促し、結果的に耐塩性を向上させる。植物では Na^+ 排出ポンプの存在は不明であるが、シロイヌナズナのゲノムデータベースに *HAL3* ホモログ遺伝子の部分配列が見出された。そこで本研究では、タバコから *HAL3* ホモログ遺伝子 (*NtHAL3*) を単離し、その塩ストレス抵抗性に関する機能の解明を目的とした。

AtHAL3 の部分配列をプローブに用いたスクリーニングの結果、タバコから 3 種のホモログ遺伝子 (*NtHAL3a, b, c*) を単離した。ノザン解析及び RT-PCR 解析より、3 種の *NtHAL* 遺伝子は根、茎、葉、茎頂、花器官およびストレス (NaCl 、 K^+) の有無に関わらず構成的に発現していた。酵母の *hal3* 欠失変異株を作製し、相補性試験を行った結果、Li (Na^+ のアナログ) 感受性を弱く相補し、*NtHAL3* タンパク質が耐塩性に関与することが示唆されたため、3 種の *NtHAL3* の全長 cDNA をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流に連結し、タバコ培養細胞 (BY2) に導入した。*NtHAL3a* 高発現 BY2 は NaCl 、 LiCl およびソルビトール (浸透圧ストレス) ストレスに対する抵抗性が向上し、一方、*NtHAL3c* 高発現 BY2 は NaCl およびソルビトールストレスに対する抵抗性のみが向上した。*NtHAL3b* 高発現 BY2 は得られなかった。*NtHAL3a* および *NtHAL3c* の高発現 BY2 細胞内の陽イオン (Na^+ 、 Li^+ 、 K^+) 含量は野生型細胞と大差なかった。次にアミノ酸含量の測定の結果、*NtHAL3a* 高発現 BY2 ではプロリンの割合が対照細胞よりも約 4 倍高かった。

これまでに、*AtHAL3a* タンパク質が補酵素 A 合成系の PPC-DC 活性を有することが報告された。そこで、大腸菌の PPC-DC 遺伝子 (*dfp*) の温度感受性変異を用いて相補性試験を行ったところ、*NtHAL3a, b, c* 全てが *dfp* 変異を相補した。以上の結果から、*NtHAL3a* の高発現によって上昇した PPC-DC 活性が補酵素 A 合成を増加させ、さらに、その下流にあるプロリン等のアミノ酸量が増加したという作用モデルが考えられた。しかし、プロリンを含むアミノ酸の蓄積量では、*NtHAL3a* および *NtHAL3c* 高発現 BY2 で見られた浸透圧ストレスに対する耐性を説明するのは難しい。一方、*NtHAL3a* および *NtHAL3c* 高発現 BY2 の細胞内浸透圧は対照細胞の約 1.5 倍であり、*NtHAL3a* および *NtHAL3c* 高発現細胞中では未同定の浸透圧調節物質が蓄積していることが示唆された。つまり、*NtHAL3a* および *NtHAL3c* 高発現により細胞内の浸透圧が高くなることが高浸透圧ストレス耐性の向上に寄与したと判断される。以上の結果から、*NtHAL3a* は NaCl 、 LiCl (Na^+ 毒性) およびソルビトール (高浸透圧ストレス) に対して耐性を付与する、耐塩性植物の分子育種に役立つ遺伝子であると結論した。そこで、*NtHAL3a* 高蓄積形質転換タバコ植物体を作製したところ、100 mM NaCl ストレスに対する耐性の向上が認められた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 與那嶺 育子

酵母は塩ストレスに遭遇すると細胞内の Na^+ は、主に Na^+ -ATPase である Ena1 により排出される。*ENA1* 遺伝子は2種の脱リン酸化酵素、PP2B、Ppz1、によって発現がそれぞれ正と負に制御されている。さらに、Hal3 タンパク質は Ppz1 を負に制御している。したがって、*HAL3* 遺伝子の高発現は *ENA1* 遺伝子の発現を促し、結果的に耐塩性を向上させることが知られている。植物では *ENA1*、*HAL3* の存在は不明であったが、シロイヌナズナのゲノムデータベースに *HAL3* ホモログ遺伝子の部分配列が見出された。そこで、本論文では、植物においても酵母と類似の機構が存在すると予想し、タバコから *HAL3* ホモログ遺伝子 (*NtHAL3*) を単離し、機能を解明することを目的として研究を開始している。

まず、*AtHAL3*の部分配列をプローブにして、タバコから3種のホモログ遺伝子 (*NtHAL3a, b, c*) を単離している。3種の *NtHAL3* 遺伝子は根、茎、葉、茎頂、花器官およびストレス (NaCl 、 K^+) の有無に関わらず構成的に発現していることをノザン解析及びRT-PCR解析より示している。酵母の *hal3* 欠失変異株を作製し、相補性試験を行った結果、各遺伝子は Li (Na^+ のアナログ) 感受性を弱く相補することから、植物においても耐塩性に関与する機能があることを示唆している。そこで、*NtHAL3* の全長 cDNA をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流に連結し、タバコ培養細胞 (BY2) に導入し、植物における機能解析を行った。その結果、*NtHAL3a* 高発現 BY2 は NaCl 、 LiCl およびソルビトール (浸透圧ストレス) ストレスに対する抵抗性が向上することを明らかにしている。ところが、*NtHAL3a* 高発現 BY2 細胞内の陽イオン (Na^+ 、 Li^+ 、 K^+) 含量は野生型細胞と大差なく、細胞内アミノ酸の中で、特に、プロリンの含量が約4倍上昇していることを見出した。興味深いことに、*NtHAL3a, b, c* 全てが補酵素A合成系の PPC-DC 活性を有することを、大腸菌の PPC-DC 遺伝子 (*dfp*) の温度感受性変異株の相補性試験により示した。また、酵母の *HAL3* はこの変異を相補しなかった。*NtHAL3* において、大腸菌の PPC-DC の活性中心のアミノ酸に相当するヒスチジンをアスパラギンに置換すると、相補能を失うことも示している。また、*NtHAL3a* および *NtHAL3c* 高発現 BY2 の細胞内浸透圧は対照細胞の約1.5倍であるが、プロリンを含むアミノ酸の蓄積量では、説明できないことから、*NtHAL3a* の高発現によって上昇した PPC-DC 活性が補酵素A合成を増加させ、その下流にあるプロリンおよび未同定の浸透圧調節物質が蓄積している作業仮説を提唱している。

そこで、*NtHAL3* が耐塩性植物の分子育種のツールになると考え、*NtHAL3a* 高蓄積形質転換タバコ植物体を作製し、100 mM NaCl ストレスに対する耐性が向上することを示した。

以上のように、本論文はタバコの *NtHAL3* 遺伝子が酵母の遺伝子とは異なる新たな機能を見出し、耐塩性植物の分子育種に利用できることを形質転換タバコで証明したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。